

04 FEB 2005

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年2月19日 (19.02.2004)

PCT

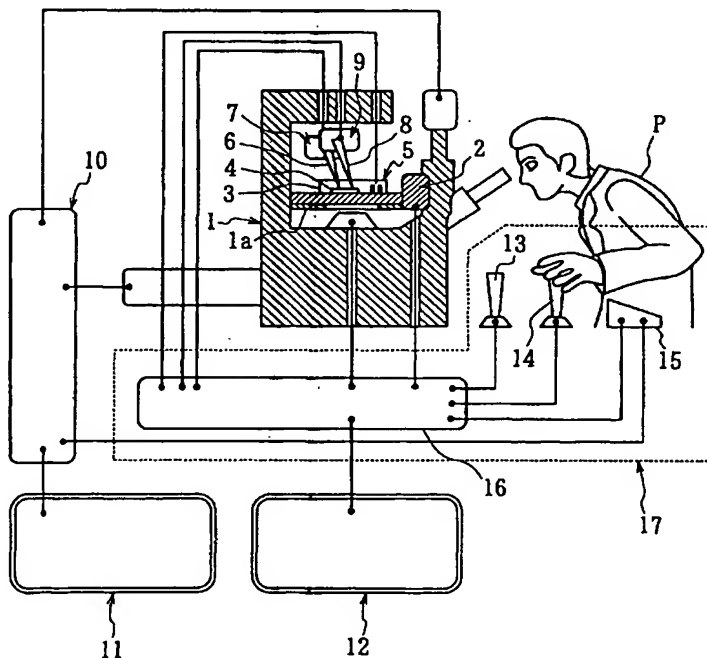
(10) 国際公開番号  
WO 2004/015055 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12M 1/00, G01N 1/28  
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2002/008139  
 (22) 国際出願日: 2002年8月8日 (08.08.2002)  
 (25) 国際出願の言語: 日本語  
 (26) 国際公開の言語: 日本語  
 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東京農工大学長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒183-8538 東京都府中市晴見町 3-8-1 Tokyo (JP).  
 (72) 発明者; および  
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松岡 英明 (MAT-SUOKA, Hideaki) [JP/JP]; 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-2 4-1 6 東京農工大学 工学部 生命工学科内 Tokyo (JP). 齊藤 美佳子 (SAITO, Mikako) [JP/JP]; 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-2 4-1 6 東京農工大学 工学部 生命工学科内 Tokyo (JP).  
 (74) 代理人: 杉村 興作, 外 (SUGIMURA, Kosaku et al.); 〒100-0013 東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 4 号 霞山ビルディング Tokyo (JP).  
 (81) 指定国 (国内): JP, US.  
 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).  
 添付公開書類:  
 — 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: SINGLE CELL OPERATION SUPPORTING ROBOT

(54) 発明の名称: 単一細胞操作支援ロボット



(57) Abstract: A single cell operation supporting robot capable of performing an operation difficult to perform by an operator by himself, according to an instruction of the operator and supporting a multi-purpose single cell operation. This robot comprises a microscope (1), a multi-microwell (4) for accommodating cell and a single cell stimulation device (5) which are provided on a stage (1a) of the microscope (1), a sample pouring and moving device (7) and an auto-stage (2) for moving a capillary (6) for pouring a sample into a single cell relatively to the multi-microwell (4), a cell moving device (9) for moving the capillary (8) holding the single cell relatively to each of the multi-microwell (4), the single cell stimulation device (5) and the capillary (6), a microspectrographic measurement device (10) combined with the microscope (1), computers (11 and 12) for automatically controlling operation of at least one of the microscope (1), the sample pouring and moving device (7), the cell moving device (9), the auto-stage (2), the single cell stimulation device (5) and the microspectrographic measurement device (10), and a manual operation device (17) for operating the microscope (1), etc. by inputting a signal into the computers (11 and 12) based on the operation by the operator.

[続葉有]

WO 2004/015055 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

作業者が自ら実行することが困難な作業を作業者の指示に従って実行して多目的な単一細胞操作作業を支援する単一細胞操作支援ロボットである。このロボットは、顕微鏡1と、その顕微鏡1のステージ1a上にそれぞれ設けられた細胞収納用マルチマイクロウェル4および単一細胞刺激装置5と、単一細胞に試料を注入するキャピラリー6をマルチマイクロウェル4に対して相対移動させる試料注入移動装置7およびオートステージ2と、単一細胞を保持するキャピラリー8をマルチマイクロウェル4と単一細胞刺激装置5とキャピラリー6とのそれぞれに対し相対移動させる細胞移動装置9と、顕微鏡1に組み合わされた顕微分光計測装置10と、顕微鏡1と試料注入移動装置7と細胞移動装置9とオートステージ2と単一細胞刺激装置5と顕微分光計測装置10との内の少なくとも一つの作動を自動制御するコンピューター11、12と、作業者による操作に基づきコンピューター11、12に信号を入力して上記顕微鏡1等を作動させるマニュアル操作装置17とを具えてなる。

## 明 細 書

## 単一細胞操作支援ロボット

## 技術分野

この発明は、動植物細胞の単一細胞（直径が十数 $\mu\text{m}$ 以上）を1個ずつ操作する作業を支援するロボットに関するものである。

## 背景技術

従来、顕微鏡ステージ上での、単一細胞の保持、移動および配置、細胞内への遺伝子や薬剤等種々の試料のインジェクション、細胞への刺激（電氣的、熱、機械的、電気化学的）の印加、そして細胞応答および細胞分子動態の計測からなる一連の操作の中の多くは、繊細で熟練を要し、作業者が自ら実行することが困難な作業であった。また従来は、多くの単一細胞を個々に識別して扱うことが困難であったため、単一細胞を集団として操作するか、あるいは1個ずつ操作しても各操作の後は単一細胞を個々に識別せず集団として扱わざるをえなかった。

それゆえこの発明は、作業者が自ら実行することが困難な作業を作業者の指示に従って実行することによって多目的な単一細胞操作作業を支援するロボットを提供することを目的とする。またこの発明は、多くの単一細胞をナンバリングして識別可能にするロボットを提供することを目的とする。

## 発明の開示

上記目的を達成する、この発明の単一細胞操作支援ロボットは、顕微鏡と、前記顕微鏡のステージ上にそれぞれ設けられた細胞収納用マイクロウェルおよび単一細胞刺激装置と、単一細胞に試料を注入する試料注入手段を前記細胞収納用マイクロウェルに対して相対移動させる試料注入移動手段と、単一細胞を保持する

細胞保持手段を前記細胞収納用マイクロウェルと前記単一細胞刺激装置と前記試料注入手段とのそれぞれに対し相対移動させる細胞移動手段と、前記顕微鏡に組み合わされた単一細胞計測装置と、前記顕微鏡と前記試料注入移動手段と前記細胞移動手段と前記単一細胞刺激装置と前記単一細胞計測装置との内の少なくとも一つの作動をあらかじめ与えられたプログラムに基づき自動制御する少なくとも一つのコンピューターと、作業者による操作に基づき前記コンピューターに信号を入力して前記顕微鏡と前記試料注入移動手段と前記細胞移動手段と前記単一細胞刺激装置と前記単一細胞計測装置との内の少なくとも一つを前記操作に対応させて作動させるマニュアル操作手段と、を具えてなるものである。

かかる単一細胞操作支援ロボットにあっては、顕微鏡と、単一細胞に試料を注入する試料注入手段を顕微鏡のステージ上に設けられた細胞収納用マイクロウェルに対して相対移動させる試料注入移動手段と、単一細胞を保持する細胞保持手段を顕微鏡のステージ上にそれぞれ設けられた細胞収納用マイクロウェルおよび単一細胞刺激装置と試料注入手段とのそれぞれに対し相対移動させる細胞移動手段と、単一細胞刺激装置と、顕微分光計測装置等の単一細胞計測装置との内の少なくとも一つの作動を、少なくとも一つのコンピュータが、あらかじめ与えられたプログラムに基づき自動制御するとともに、それら顕微鏡と試料注入移動手段と細胞移動手段と単一細胞刺激装置と単一細胞計測装置との内の少なくとも一つを、マニュアル操作手段がコンピューターに信号を入力して作動させる。

従って、この発明の単一細胞操作支援ロボットによれば、高い位置精度と迅速な移動とが要求される、単一細胞の保持・移動や、単一細胞に近接する位置への試料注入手段の移動や、それらの作業の間の顕微鏡の倍率変更や、単一細胞の刺激や、その後の、顕微分光計測装置等の単一細胞計測装置による計測を自動的に行うことができるので、所要に応じてそれらの操作の一部または全てを自動化し得て、作業者の負担を大幅に削減することができ、これにより作業者は、特に注意を要する単一細胞内への試料の注入や計測結果の分析判断等の作業に専念する

ことができる。

なお、この発明の単一細胞操作支援ロボットにおいては、前記細胞収納用マイクロウェルが、1個の単一細胞に対する専用ウェルとしてそれぞれ使用し得る複数のウェルが所定配置で並べて配置されているマルチマイクロウェルであると好ましい。一連の細胞操作を通じて複数のウェルをそれぞれ1個の単一細胞に対する専用ウェルとして使用でき、しかも複数のウェルが所定配置で並べて配置されているので、複数の単一細胞をそれらを収納するウェルの位置に基づきナンバリングして識別し得て、より条件設定の細かい細胞操作を行い得るからである。

また、この発明の単一細胞操作支援ロボットにおいては、前記試料注入移動手段が、前記顕微鏡のステージ上に設けられて前記細胞収納用マイクロウェルおよび単一細胞刺激装置を前記ステージに対し移動させるオートステージを有していると好ましい。試料注入手段側の移動範囲を狭め得て、細胞移動手段との干渉を容易に防止し得るからである。

さらに、この発明の単一細胞操作支援ロボットにおいては、前記試料注入移動手段が、前記試料注入手段を前記ステージに対し移動させるマニピュレーターを有していると好ましい。より細かい注入操作ができるからである。

さらに、この発明の単一細胞操作支援ロボットにおいては、前記細胞移動手段が、前記顕微鏡のステージ上に設けられて前記細胞収納用マイクロウェルおよび単一細胞刺激装置を前記ステージに対し移動させるオートステージを有していると好ましい。細胞保持手段側の移動範囲を狭め得て、試料注入移動手段との干渉を容易に防止し得るからである。そして、そのオートステージは前記試料注入移動手段と共用すると、移動のための機構を簡略化し得て、スペース効率上および製作コスト上、より好ましい。

そして、この発明の単一細胞操作支援ロボットにおいては、前記細胞移動手段が、前記細胞保持手段を前記ステージに対し移動させるマニピュレーターを有していると好ましい。より細かい移動操作ができるからである。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、この発明の単一細胞操作支援ロボットの一実施例を模式的に示す構成図である。図 2 は、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した遺伝子発現実験に用いたプラスミドを示す説明図である。図 3 は、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した遺伝子発現実験における遺伝子注入の操作を示す説明図である。図 4 は、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した遺伝子発現実験における  $Ca^{2+}$  注入の操作を示す説明図である。図 5 は、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した遺伝子発現実験における顕微蛍光計測の方法を示す説明図である。図 6 は、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した他の遺伝子発現実験における遺伝子注入の操作を示す説明図である。図 7 は、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した上記他の遺伝子発現実験における電氣的刺激印加の操作を示す説明図である。図 8 は、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットにおける単一細胞刺激装置の構成を示す説明図である。そして図 9 は、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した上記他の遺伝子発現実験における電氣的刺激印加後の操作を示す説明図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下に、この発明の実施の形態を実施例によって、図面に基づき詳細に説明する。ここに、図 1 は、この発明の単一細胞操作支援ロボットの一実施例を示す構成図であり、この実施例の単一細胞操作支援ロボットは、図示のように、顕微鏡 1 と、その顕微鏡 1 のステージ 1 a 上に設けられたオートステージ 2 上に固定された培養ディッシュ 3 内にそれぞれ設けられた細胞収納用マイクロウェルとしての細胞収納用マルチマイクロウェル 4 および単一細胞刺激装置 5 と、単一細胞に試料を注入する試料注入手段としてのガラスキャピラリー 6 を細胞収納用マルチマイクロウェル 4 に対して相対移動させる試料注入移動手段を構成する試料注入

移動装置 7 と、単一細胞を保持する細胞保持手段としてのもう一つのガラスキャピラリー 8 を細胞収納用マルチマイクロウェル 4 と単一細胞刺激装置 5 と先のガラスキャピラリー 6 とのそれぞれに対し相対移動させる細胞移動手段を構成する細胞移動装置 9 と、顕微鏡 1 に組み合わされた単一細胞計測装置としての顕微分光計測装置 10 と、これも試料注入移動手段と細胞移動手段とに共用されてそれらを構成する上記オートステージ 2 と、を具えている。

さらに、この実施例の単一細胞操作支援ロボットは、顕微鏡 1 と顕微分光計測装置 10 との内の少なくとも一つの作動をあらかじめ与えられたプログラムに基づき自動制御するパーソナルコンピューター (PC) 11 と、単一細胞刺激装置 5 と試料注入移動装置 7 と細胞移動装置 9 とオートステージ 2 との内の少なくとも一つの作動をあらかじめ与えられたプログラムに基づき自動制御するもう一つのパーソナルコンピューター (PC) 12 と、作業者による操作に基づき PC 11, 12 に信号を入力して顕微鏡 1 と単一細胞刺激装置 5 と試料注入移動装置 7 と細胞移動装置 9 と顕微分光計測装置 10 とオートステージ 2 との内の少なくとも一つを上記操作に対応させて作動させるマニュアル操作手段としての、二つのジョイスティック型コントローラー 13, 14 およびキーボード 15 とインターフェース 16 とを有するマニュアル操作装置 17 と、を具えている。なお、作業者 P は、顕微鏡 1 を覗きながらあるいは顕微鏡像のモニター画像を見ながら、ジョイスティック型コントローラー 13, 14 を操作することで、オートステージ 2、試料注入移動装置 7 および細胞移動装置 9 の作動を制御することができる。そして PC 11, 12 は、インターフェース 16 を介した上記各要素の監視、自動制御およびマニュアル制御、計測データの記録および画像処理等に必要な演算や解析を行う。

この実施例の単一細胞操作支援ロボットでは、顕微鏡 1 には、オリンパス光学工業株式会社製の、落射蛍光装置 (励起光照射装置) 付きの倒立型蛍光顕微鏡 IMT-2 を用いる。また、オートステージ 2 は、中央精機株式会社製の通常の 2

軸直交座標型移動テーブル（2軸電動制御）からなる。さらに、試料注入移動装置7は、エッペンドルフ社製の3自由度マニピュレーター（x, y, z軸、xy平面からの角度 $\theta$ の内の3自由度を電動制御）で株式会社ナリシゲ製の1軸直線作動型マイクロマニピュレーター（手動操作油圧作動式）を支持し、その1軸直線作動型マニピュレーターで通常のインジェクションホルダーを支持してなり、単一細胞に試料を注入するガラスキャピラリー6は、そのインジェクションホルダーに取り付けて4自由度で移動可能としている。

またこの実施例の単一細胞操作支援ロボットでは、細胞移動装置9は、通常の3軸直交座標型マニピュレーターで1軸直線作動型マニピュレーターを支持し、その1軸直線作動型マニピュレーターで通常のインジェクションホルダーを支持してなり、単一細胞を保持するもう一つのガラスキャピラリー8は、そのインジェクションホルダーに取り付けて4自由度で移動可能としている。

さらにこの実施例の単一細胞操作支援ロボットでは、細胞収納用マルチマイクロウェル4は、顕微鏡視野内において、ウェル内溶液中への細胞1個の収納、ウェル内での刺激印加の操作、細胞の光学的・電氣的・電気化学的・物理的測定、ウェルから他の場所への移送等を行うため、塩化ビニル板の表面に単一細胞の収納用の直径約100 $\mu$ mの窪みであるウェル4aを所定の2箇所所定間隔で縦5個×横10個ずつ合計100個並べて形成したマルチマイクロウェルであり、また単一細胞刺激装置5は、細胞収納用マルチマイクロウェルから取り出した細胞に、顕微鏡視野内の他所で、電氣的・熱的・機械的あるいは化学的刺激を印加する微小デバイスであり、図1に示す例では、細胞に電氣的刺激を印加するために、図8に示すように2枚のPt（プラチナ）板電極5aをそれぞれアクリル板5bと透析膜5cとで挟み、各Pt板電極5aにPtリード線5dを設けてなるものである。なお、ここでは試料注入移動装置7も、細胞収納用マルチマイクロウェル内に挿入されて細胞に電氣的、熱的、機械的または化学的刺激を印加する微小デバイスとなり、単一細胞刺激装置を構成する。



そして、この実施例の単一細胞操作支援ロボットでは、顕微分光計測装置10には、東京農工大学と株式会社ジェネシアとが共同で開発し、既に公知にした、空間解像度が $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ 以上、波長分解能が $400\text{nm} \sim 800\text{nm}$ の範囲で $5\text{nm}$ 以上、時間分解能が5秒毎に1画像記録可能、という性能を有するスペクトロイメージング装置を用いる。

次に、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した、イネ単一細胞への遺伝子導入と $\text{Ca}^{2+}$ 導入刺激による遺伝子発現実験について説明する。

#### 〔細胞の培養〕

イネ (*Oryza sativa* L. japonica cv. Nipponbare) の種籾を培養し、カルス化させたものを $1.0\text{mm}$ メッシュの金網で濾別して用いた。 $100\text{ml}$ フラスコに $27\text{ml}$ の専用培地を入れ、そこで回転培養 ( $100\text{rpm}$ 、 $25^\circ\text{C}$ 、暗所) した。一週毎に継代して培養を続け、最終の継代後、4日目の培養細胞を以下の実験に用いた。

〔プラスミドの調製 (プラスミドとは環状DNAで、このリングの中に遺伝子を組み込むことができる)〕

クロンテック (CLONTECH) 社より購入したプラスミド35S-GFPは、植物細胞の中ではいつでも遺伝子発現をさせることができる「35S」と呼ばれるプロモーターにグリーン蛍光タンパク (green fluorescent protein; GFP) の遺伝子を結合させたものが組み込まれている。従って、これを植物細胞に導入すれば細胞内にGFPが生成し緑色の蛍光を発するようになる。

このプラスミドの35Sプロモーターの部分、イネキチナーゼ (CHI) 遺伝子のプロモーターと入れ換えたものである、図2に示す如きpCHI-GFPを作成し、以後の実験で使用した。これを導入した細胞では、エリシター (カビの細胞壁の構成成分であるキチンの構造をもったオリゴ糖) を作用させると、元々キチナーゼ遺伝子が発現するはずであるが、キチナーゼの代わりにGFPの遺伝子が組み込まれているので、「キチナーゼ遺伝子発現」の情報が「GFP」の生成

によって可視化できる。これを顕微蛍光計測する。

〔イネプロトプラストの調製〕

植え継ぎ後4日のイネカルスを用いてプロトプラストを調製した。即ち、カルス懸濁液から上清を除去した後、洗い液（0.4 Mマンニトール溶液）を加え洗浄した。これに、酵素液10 mlを加え、30℃、30 rpm、暗所で一時間振とうし、引き続き2時間、30℃で静置培養した。培養後、プロトプラストは、40  $\mu$ mφのナイロンメッシュを通して、50 ml遠心管に回収した。次に、遠心管を再度、1000 rpmで60秒遠心し、プロトプラストを沈殿させた。上清の酵素液を除去した後、プロトプラスト用培地を5 ml加えてプロトプラストを懸濁させた。プロトプラストとは細胞壁を除去した細胞であるが、以下では単に「細胞」と表記することとする。

なお、上記洗い液と酵素液の組成は次の通りである。

a. 洗い液（0.4 Mマンニトール溶液）

マンニトール	36.43 g
蒸留水	500 ml

b. 酵素液（pH 5.6）

ペクトリアーゼ Y-23	0.05 g
セルラーゼ オノズカ RS	2.0 g
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.23 ml
Kデキストランサルフェート	0.1 g
マンニトール	9.0 g
蒸留水	200 ml

〔細胞の保持および移動に用いるガラスキャピラリー6の作製〕

一本型ガラスキャピラリー（直径1 mm）（GD-1、株式会社ナリシゲ製）をエタノールで洗浄し、3時間乾熱機で滅菌した。これを二段引きプラー（PP83、株式会社ナリシゲ製）で引き、さらにマイクロフォーger（MF-83、株式

会社ナリシゲ製)で先端を丸めた。最終的にキャピラリーの先端部は外径=約50  $\mu\text{m}$ 、内径=約20  $\mu\text{m}$ になるようにした。

〔細胞の刺入に用いるガラスキャピラリー8の作製〕

滅菌したガラスキャピラリーをレーザーブラー (P-2000、SUTTER INSTRUMENT Co.)で引き、先端径が1  $\mu\text{m}$ 以下になるようにした。

〔プラスミドのインジェクション〕

図3に示すように、まず、 $1.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ に調整したプラスミド35S-GFP溶液を、細胞刺入用のガラスキャピラリー8内に注入した。このガラスキャピラリー8を前記インジェクションホルダーに保持させるとともにピコポンプに接続して、窒素ガスの圧力をかけてGFPの遺伝子Geを注入できるようにした。一方、細胞保持用のガラスキャピラリー6は、もう一方の前記インジェクションホルダーに固定し、内部を純水で充填するとともにインジェクターに接続して、そのインジェクターで細胞Ceを吸引保持できるようにした。

次いで、マルチマイクロウェル4を装着した培養ディッシュ3を、顕微鏡1のステージ1a上に載せて固定し、図3中①で示すように、ディッシュ3の底に分散された細胞(直径約20~30  $\mu\text{m}$ )Ce1個を選び、これを図3中②で示すように、細胞保持用のガラスキャピラリー6で吸引保持した。この細胞Ceの原形質内に試料注入移動装置7を用いて、図3中③で示すように細胞刺入用のガラスキャピラリー8を刺入し、ピコポンプでガラスキャピラリー8内に圧力をかけて遺伝子Geを細胞内部に注入した。遺伝子注入(マイクロインジェクション)を行った細胞Ceは、PC12で自動制御したオートステージ2と細胞移動装置9の各マニピュレーターとにより、図3中④、⑤で示すように移動させて、マルチマイクロウェル4の所定番地のウェル4a内に収納し、ナンバリング(番号付け)した。このようにして50個あるいは100個の細胞に対するマイクロインジェクション及び細胞収納操作を終了した後、図3中⑥で示すように、それらの細胞Ceを25℃で24時間静置培養した。

〔 $\text{Ca}^{2+}$ の細胞内インジェクション〕

24時間の培養によって、細胞Ceはウェルの底面に接着した。この細胞Ceに試料注入移動装置7を用いて、図4に示すように、 $\text{CaCl}_2$  ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ , または  $100\mu\text{M}$ ) を充填した細胞刺入用のガラスキャピラリー8を刺入し、 $\text{Ca}^{2+}$ を注入した。その後さらに24時間 $25^\circ\text{C}$ で培養を続けた後、図5に示すように、顕微鏡1及び顕微分光分析装置10を用いて細胞Ceを撮影し、GFPの生成の有無を顕微蛍光計測で調べた。なお、図中符号18はグリズム、19はCCDカメラを示す。

## 〔キチナーゼ遺伝子の発現測定〕

$\text{Ca}^{2+}$ のインジェクションによってキチナーゼ遺伝子が発現した頻度は、 $\text{CaCl}_2$ の濃度が $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ のときそれぞれ、18% (50細胞中9個), 12% (50細胞中6個), 0% (50細胞中0個) であった。

最後に、上記実施例の単一細胞操作支援ロボットを使用した、イネ単一細胞への遺伝子導入と電氣的刺激による遺伝子発現実験について説明する。なお、細胞の培養と、プラスミドの調製と、イネプロトプラストの調製と、細胞の保持および移動に用いるキャピラリー6の作製と、細胞刺入用のキャピラリー8の作製との手順は、先の実験と同様ゆえ説明を省略する。

## 〔プラスミドのインジェクション〕

図6に示すように、各ウェル4aの直径が $100\sim 200\mu\text{m}$ であるマルチマイクロウェル4に細胞Ceを収納する以外は、先の実験と同様である。

## 〔Fura2の細胞内への導入〕

マルチマイクロウェル4で培養した細胞に対して、DMSOに溶解させたFura2-AM (DOJINDO)を終濃度 $4\mu\text{M}$ になるように添加し、これを $30^\circ\text{C}$ 、暗所、静置にて1時間取り込ませた。そして細胞外液を新鮮な培地と交換した後、以下の電気刺激実験を行った。

## 〔電気刺激の印加〕

図7中①で示すように、マルチマイクロウェル4内の細胞Ceを、ホールド用のキャピラリー6で保持し、図7中②～④で示すように、図8に示す如き単一細胞刺激装置5のPt板電極5a間に移動して、図7中⑤で示すように静置し、Pt電極5a間にパルサー5eからアイソレーター5fおよびPtリード線5dを介して30Vの直流パルス電圧を30秒間印加した。この電氣的刺激の印加後、図9中①～⑤で示すようにして細胞Ceを再び元のウェル4aに収納し、25℃で24時間培養した。

〔キチナーゼ遺伝子の発現測定〕

先の実験と同様にして顕微蛍光計測で100個の細胞を調べた結果、電氣的刺激によって細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の一過性の上昇（25秒程度でピークに達し、50秒後に元のレベルにもどった）が見られた細胞が6個あった。これらの細胞は全て遺伝子も発現した。次のケースは、徐々に増大するパターン（100秒くらいでピークに達し、その後徐々に減少したが元のレベルには戻らなかった）を示した細胞が2個認められた。この細胞でも遺伝子発現が認められた。一方、 $Ca^{2+}$ 濃度変化の見られなかった細胞では、遺伝子発現が認められなかったが、最後にエリシターを作用させたところ、遺伝子発現がみとめられたものが6個あった。以上の結果、電氣的刺激によって $Ca^{2+}$ の細胞内への流入を介してキチナーゼ遺伝子発現が誘導されることが示された。

かくしてこの実施例の単一細胞操作支援ロボットによれば、高い位置精度と迅速な移動とが要求される、単一細胞Ceの保持・移動や、単一細胞Ceに近接する位置への細胞刺入用ガラスキャピラリー8の移動や、単一細胞Ceの刺激や、その後の顕微分光計測等を自動的に行うことができるので、所要に応じてそれらの操作の一部または全てを自動化し得て、作業者の負担を大幅に削減することができ、これにより作業者は、特に注意を要する単一細胞Ce内への試料（遺伝子や $Ca^{2+}$ ）の注入や計測結果の分析判断等の作業に専念することができる。

しかもこの実施例の単一細胞操作支援ロボットによれば、細胞収納用マイクロ

ウェルが、1個の単一細胞に対する専用ウェルとしてそれぞれ使用し得る複数のウェル4 aが所定配置で並べて配置されたマルチマイクロウェル4であることから、一連の細胞操作を通じて複数のウェル4 aをそれぞれ1個の単一細胞に対する専用ウェルとして使用でき、しかも複数のウェル4 aが所定配置で並べて配置されているので、複数の単一細胞をそれらを収納するウェル4 aの位置に基づきナンバリングして識別し得て、より条件設定の細かい細胞操作を行うことができる。

またこの実施例の単一細胞操作支援ロボットによれば、試料注入移動手段が、顕微鏡1のステージ1 a上に設けられて細胞収納用マルチマイクロウェル4および単一細胞刺激装置5をステージ1 aに対し移動させるオートステージ2を有しているので、試料注入移動装置7によるガラスキャピラリー8の移動範囲を狭め得て、細胞移動装置9との干渉を容易に防止することができる。

さらにこの実施例の単一細胞操作支援ロボットによれば、試料注入移動手段を構成する試料注入移動装置7が、ガラスキャピラリー8をステージ1 aに対し移動させるマニピュレーターを有しているので、より細かい注入操作ができる。

さらにこの実施例の単一細胞操作支援ロボットによれば、細胞移動手段が、顕微鏡1のステージ1 a上に設けられて細胞収納用マルチマイクロウェル4および単一細胞刺激装置5をステージ1 aに対し移動させるオートステージ2を有しているので、細胞移動装置9によるガラスキャピラリー6の移動範囲を狭め得て、試料注入移動装置7との干渉を容易に防止することができる。そして細胞移動手段が、そのオートステージ2を試料注入移動手段と共用しているので、移動のための機構を簡略化し得て、スペース効率を高め得るとともに製作コストを削減することができる。

そしてこの実施例の単一細胞操作支援ロボットによれば、細胞移動手段を構成する細胞移動装置9が、ガラスキャピラリー6をステージ1 aに対し移動させるマニピュレーターを有しているので、より細かい移動操作ができる。

以上、図示例に基づき説明したが、この発明は上述の例に限定されるものでなく、例えば、試料注入移動手段及び細胞移動手段をオートステージ2なしでマニピュレータのみで構成しても良く、また試料を注入するインジェクターの操作も電磁ソレノイド等で行ってコンピューター制御で自動化しても良い。さらにマニュアル操作手段は押しボタンスイッチや足踏みスイッチ等を有していても良い。また顕微鏡1はパーソナルコンピューター11により自動制御またはマニュアル制御される対物レンズ倍率電動切換え装置を具備していても良い。そして単一細胞計測装置は顕微分光計測装置以外のものでも良い。

#### 産業上の利用可能性

以上のようにこの発明の単一細胞操作支援ロボットによれば、高い位置精度と迅速な移動とが要求される、単一細胞の保持・移動や、単一細胞に近接する位置への試料注入手段の移動や、それらの作業の間の顕微鏡の倍率変更や、単一細胞の刺激や、その後の、顕微分光計測装置等の単一細胞計測装置による計測を自動的に行うことができるので、所要に応じてそれらの操作の一部または全てを自動化し得て、作業者の負担を大幅に削減することができ、これにより作業者は、特に注意を要する単一細胞内への試料の注入や計測結果の分析判断等の作業に専念することができる。

## 請 求 の 範 囲

### 1. 顕微鏡と、

前記顕微鏡のステージ上にそれぞれ設けられた細胞収納用マイクロウェルおよび単一細胞刺激装置と、

単一細胞に試料を注入する試料注入手段を前記細胞収納用マイクロウェルに対して相対移動させる試料注入移動手段と、

単一細胞を保持する細胞保持手段を前記細胞収納用マイクロウェルと前記単一細胞刺激装置と前記試料注入手段とのそれぞれに対し相対移動させる細胞移動手段と、

前記顕微鏡に組み合わされた単一細胞計測装置と、

前記顕微鏡と前記試料注入移動手段と前記細胞移動手段と前記単一細胞刺激装置と前記単一細胞計測装置との内の少なくとも一つの作動をあらかじめ与えられたプログラムに基づき自動制御する少なくとも一つのコンピューターと、

作業者による操作に基づき前記コンピューターに信号を入力して前記顕微鏡と前記試料注入移動手段と前記細胞移動手段と前記単一細胞刺激装置と前記単一細胞計測装置との内の少なくとも一つを前記操作に対応させて作動させるマニュアル操作手段と、

を具備する、単一細胞操作支援ロボット。

2. 前記細胞収納用マイクロウェルは、1個の単一細胞に対する専用ウェルとしてそれぞれ使用し得る複数のウェルが所定配置で並べて配置されているマルチマイクロウェルであることを特徴とする、請求の範囲第1項記載の単一細胞操作支援ロボット。

3. 前記試料注入移動手段は、前記顕微鏡のステージ上に設けられて前記細胞収納用マイクロウェルおよび単一細胞刺激装置を前記ステージに対し移動させるオートステージを有することを特徴とする、請求の範囲第1項記載の単一細胞操作



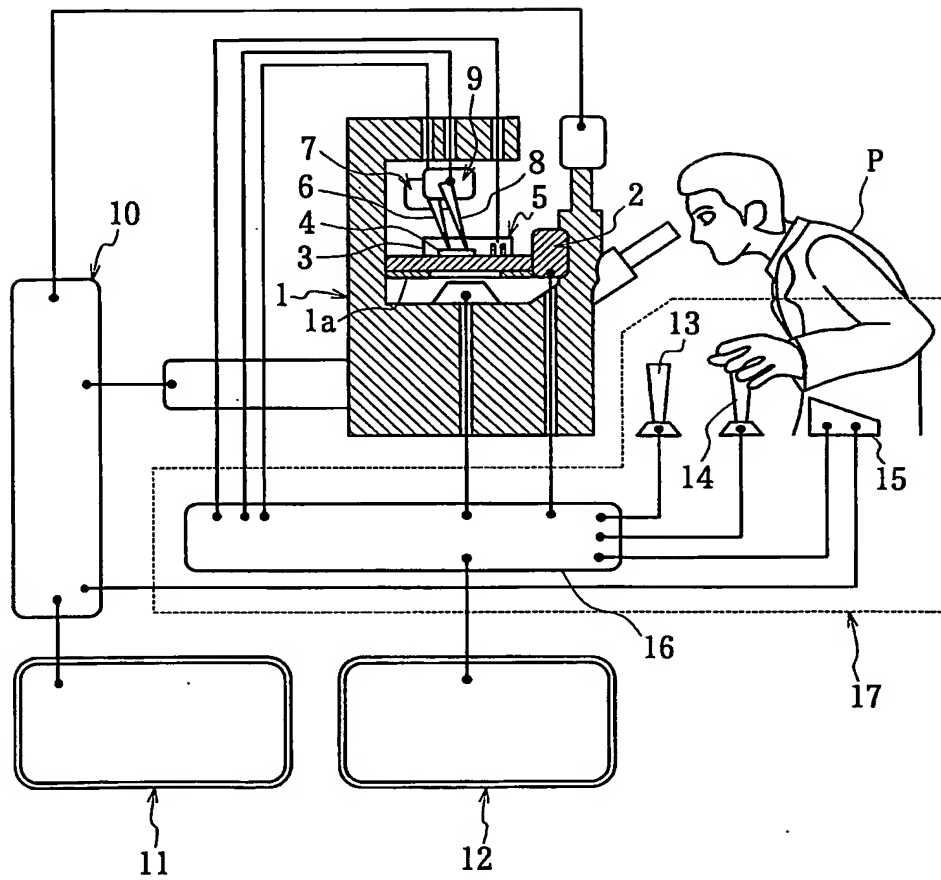
支援ロボット。

4. 前記試料注入移動手段は、前記試料注入手段を前記ステージに対し移動させるマニピュレーターを有することを特徴とする、請求の範囲第1項記載の単一細胞操作支援ロボット。

5. 前記細胞移動手段は、前記顕微鏡のステージ上に設けられて前記細胞収納用マイクロウェルおよび単一細胞刺激装置を前記ステージに対し移動させるオートステージを有することを特徴とする、請求の範囲第1項記載の単一細胞操作支援ロボット。

6. 前記細胞移動手段は、前記細胞保持手段を前記ステージに対し移動させるマニピュレーターを有することを特徴とする、請求の範囲第1項記載の単一細胞操作支援ロボット。

**FIG. 1**



**FIG. 2**

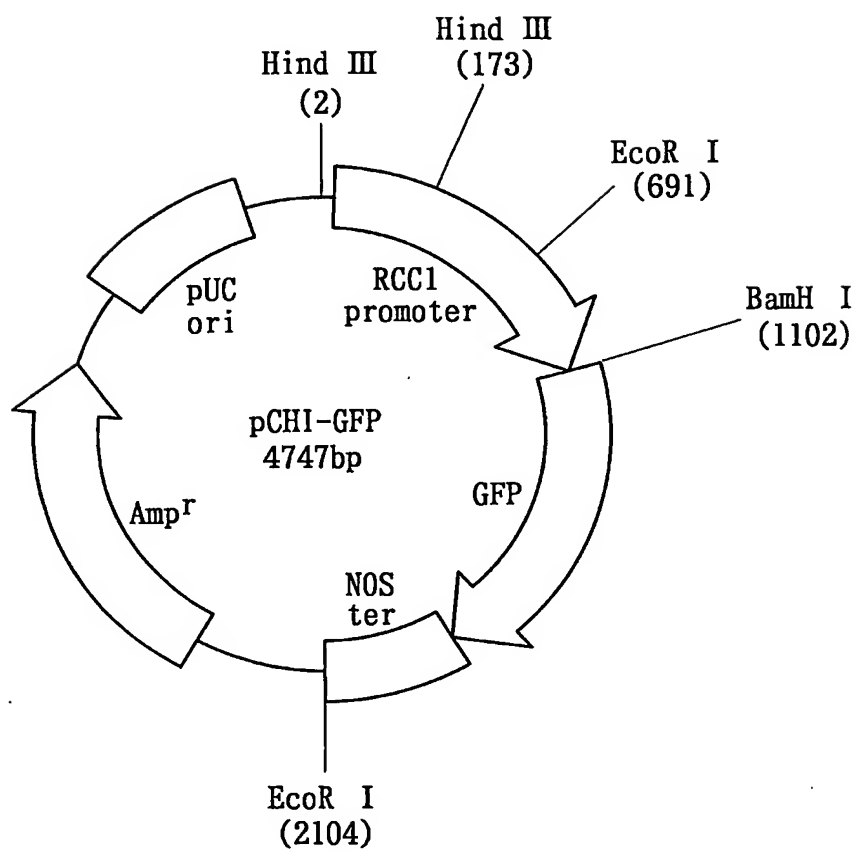
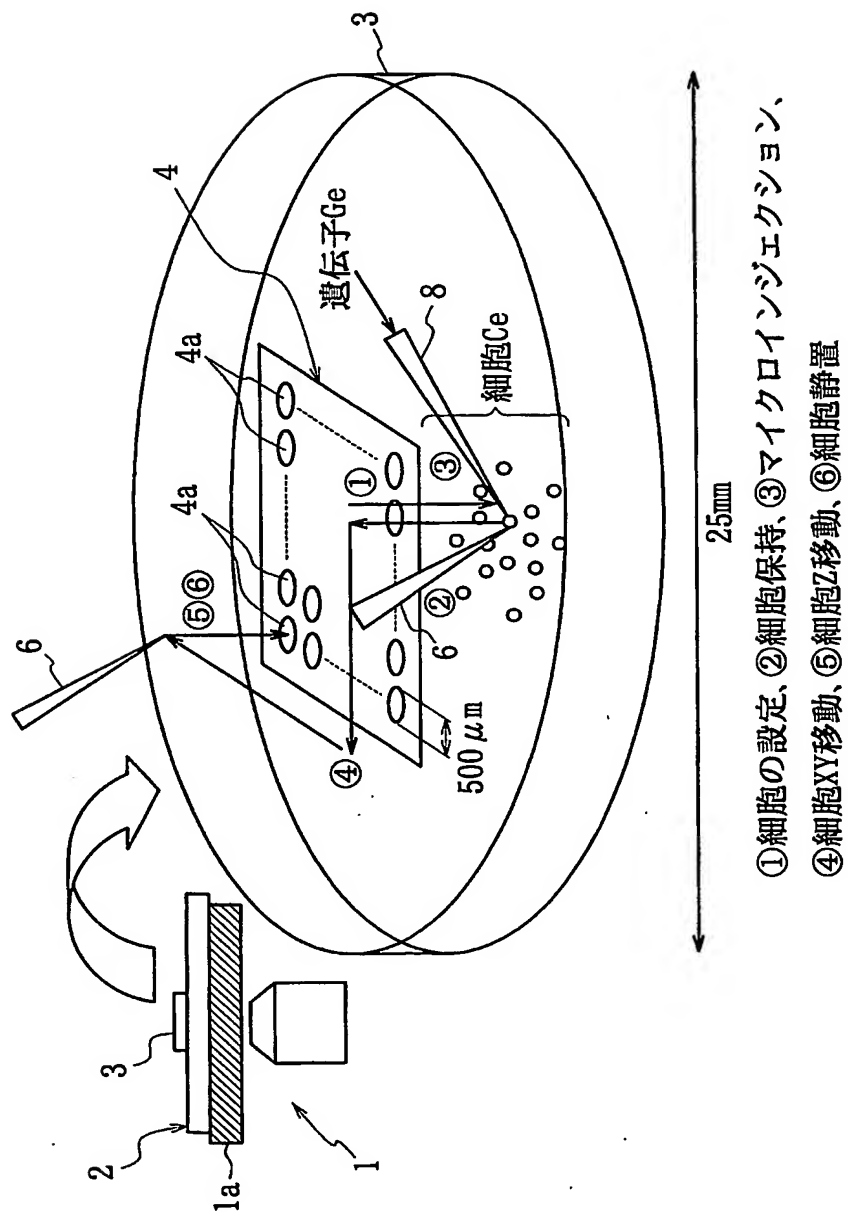
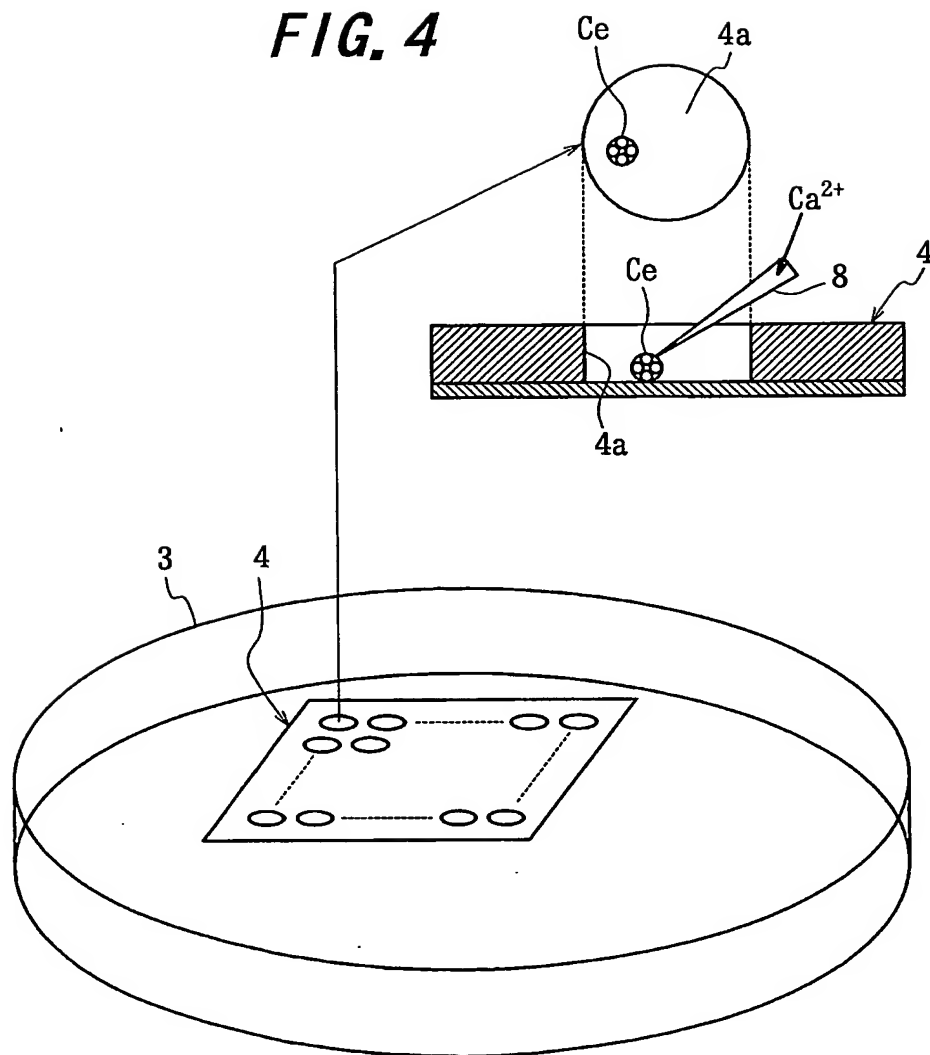


FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5**

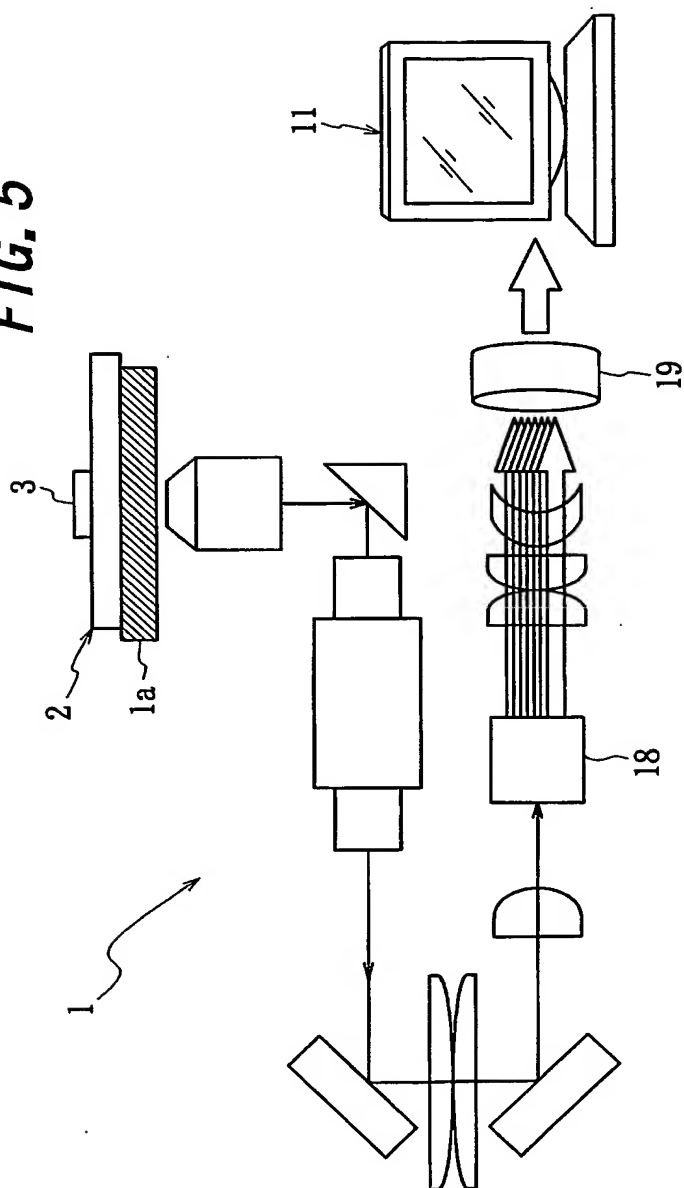
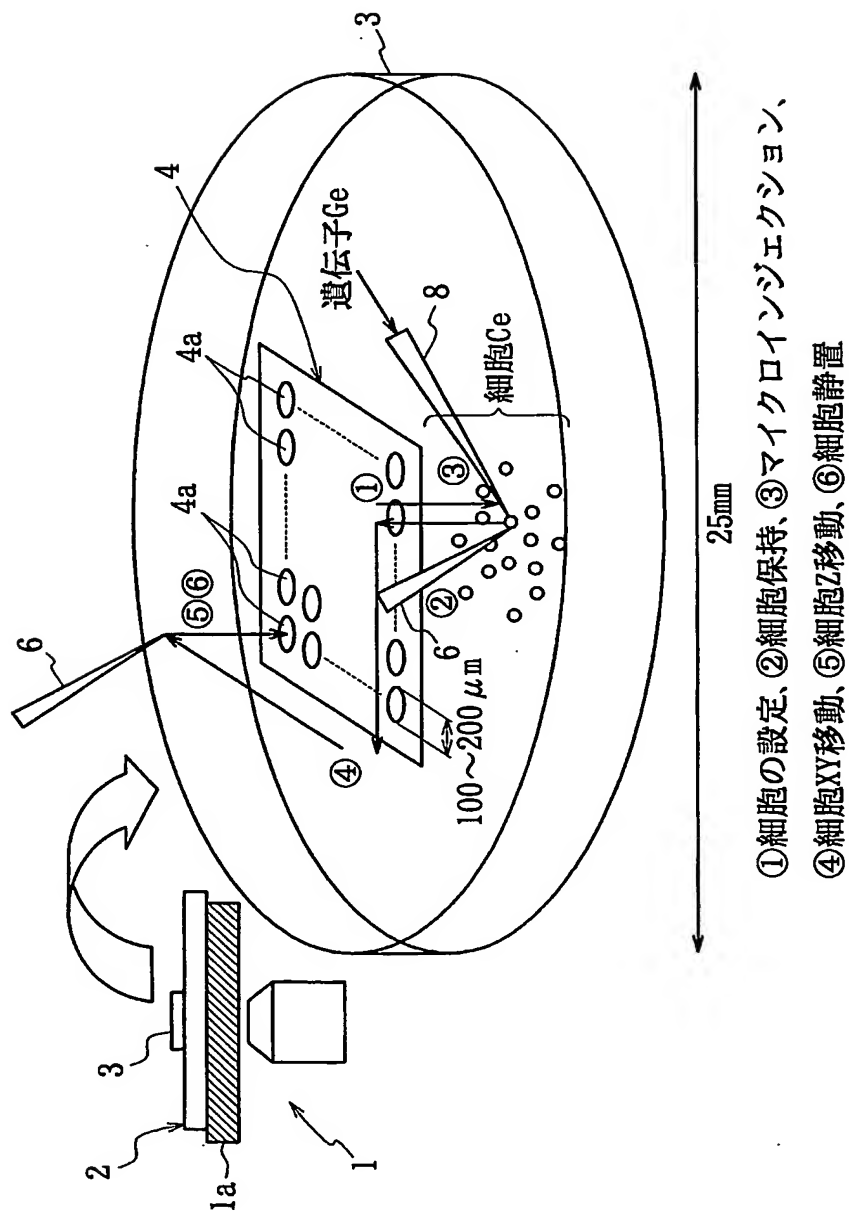


FIG. 6



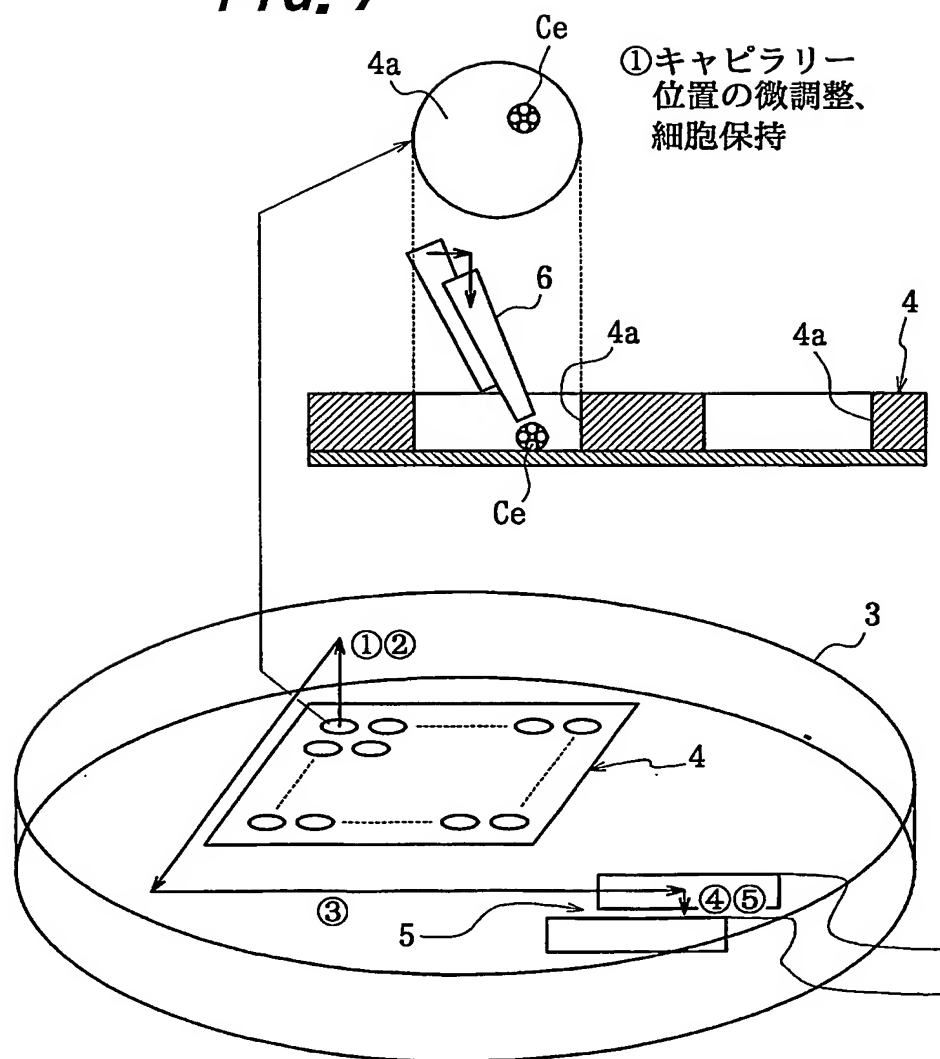
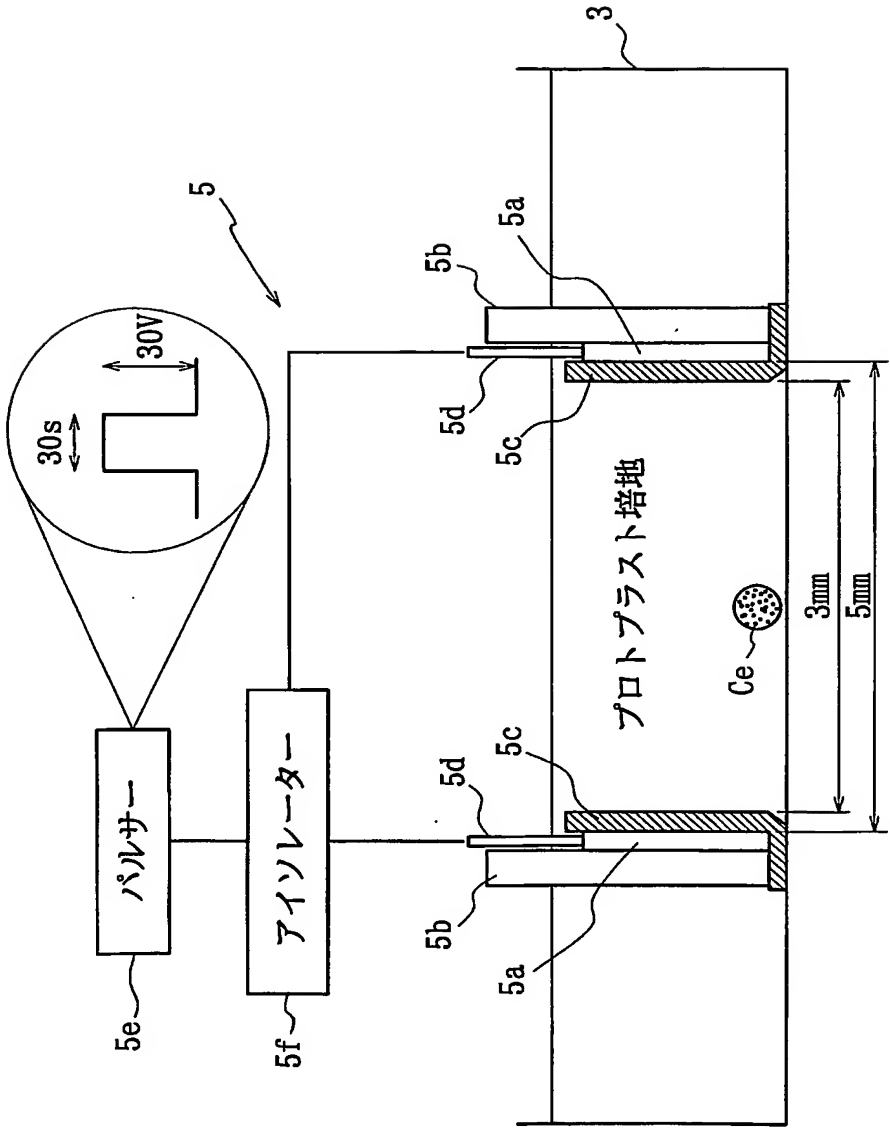
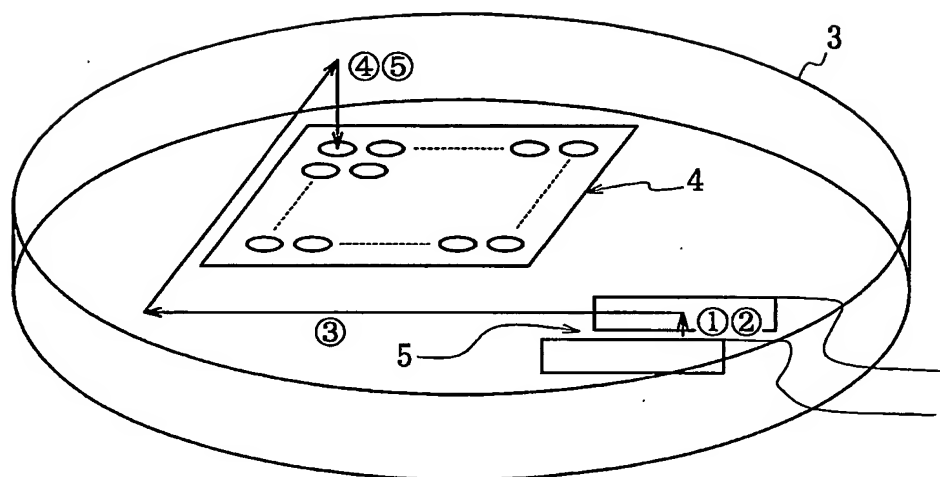
**FIG. 7**



FIG. 8



**FIG. 9**



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/00, G01N1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/00,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1182250 A2 (Hitachi, Ltd.), 27 February, 2002 (27.02.02), & JP 2002-65241 A	1-6
Y	JP 2002-27969 A (National Food Research Institute), 29 January, 2002 (29.01.02), (Family: none)	1-6
Y	JP 2000-98258 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 07 April, 2000 (07.04.00), (Family: none)	1-6
A	JP 5-322716 A (Shimadzu Corp.), 07 December, 1993 (07.12.93), (Family: none)	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 October, 2002 (21.10.02)

Date of mailing of the international search report  
05 November, 2002 (05.11.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08139

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-23657 A (Director General of National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 25 January, 2000 (25.01.00), (Family: none)	1-6

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/08139

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C12M1/00, G01N1/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 1182250 A2 (Hitachi Ltd) 2002.02.27 & JP 2002-65241 A	1-6
Y	JP 2002-27969 A (独立行政法人 食品総合研究所) 2002.01.29 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2000-98258 A (オリンパス光学工業株式会社) 2000.04.07 (ファミリーなし)	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリ

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.10.02

国際調査報告の発送日

05.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 5-322716 A (株式会社島津製作所) 1993. 12. 07 (ファミリーなし)	1 - 6
A	JP 2000-23657 A (農林水産省食品総合研究所長) 2000. 01. 25 (ファミリーなし)	1 - 6